KISEP Experimental Researches J Korean Neurosurg Soc(Supplement Ⅰ)30 : S13-S19, 2001

아데노 바이러스 Cytosine Deaminase/Thymidine Kinase 융합 유전자의 항 종양효과*

연세대학교 의과대학 신경외과학교실
김영우 · 최재영 · 장진우 · 박용구 · 정상섭

= Abstract =

Antitumor Effect of an Adenoviral Cytosine Deaminase/Thymidine Kinase Fusion Gene in C6 Glioma Cells

Young Woo Kim, M.D., Jae Young Choi, M.D., Jin Woo Chang, M.D., Ph.D., Yong Gou Park, M.D., Ph.D., Sang Sup Chung, M.D., Ph.D.
Department of Neurosurgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective : We investigated the feasibility of a double suicide gene/prodrug therapy, involving direct introduction of the herpes simplex virus Type 1 thymidine kinase(TK) gene and the Escherichia coli cytosine deaminase(CD) gene, via a recombinant adenoviral vector and ganciclovir(GCV) and/or 5 - fluorocytosine(5 - FC) treatment, in C6 glioma cells.

Methods : Efficient gene transfer and transduction of C6 glioma cells via a recombinant adenovirus were evaluated by infecting cells with adenovirus bearing the β - galactosidase gene and then staining cells with 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - 13 - D - galactoside. CD/TK expression in cells infected with adenovirus bearing the CD/TK gene(ad - CD/TK) was examined by immunoblotting analysis. For *in vitro* cytotoxicity experiments, the cells were infected with ad - CD/TK or ad - ΔE1(as a control). After addition of a variety of concentrations of GCV and 5 - FU, either separately or in combination, cell viability was determined by staining the cells with crystal violet solution 6 days after infection.

Result : C6 glioma cells were efficiently transduced with recombinant adenoviral vector at multiplicities of infection of 200 or more. *In vitro* cytotoxicity of GCV and/or 5 - FC, either alone or in combination, was exclusively observed in the cells transduced with ad - CD/TK. Obvious cytotoxicity(>50% inhibition) was observed in the presence of 5 - FC at concentrations greater than 30ug/ml or GCV at concentrations greater than 0.3ug/ml at a multiplicity of infection of 100. Additionally, cytotoxicity in the presence of both GCV and 5 - FC was greater than that after sinlge - prodrug treatments, indicating additive effects of the prodrug treatments.

Conclusion : The administration of a double - suicide gene/prodrug therapy might have great potential in the treatment of brain tumors.

KEY WORDS : Adenovirus · β - Galactosidase · Glioma · Suicide gene therapy.

서 론

최근에 뇌종양에 대한 수술적인 기법, 방사선 치료, 항암제 치료, 뇌신경 방사선 진단기술의 발전에도 불구하고 악성 뇌종양에 대한 예후는 최근 수십년간 향상되지 않고 있어 보다 효과적인 치료에 대한 연구가 진행되고 있다[5]. 유망한 치료 방법중 하나로 유전자 이식 기법은 악성종양의 치료에 있어서 최근 활발히 연구가 진행되고 있는 분야이다. 또 효소/전구약물 합성치료 기법은 새로운 치료기법으로 악

*본 연구는 1998년도 연세대학교 의과대학 장기 해외연수 교수비(과제번호 : 1998 - 3) 지원으로 이루어졌음.

성종양에 대해 선택적으로 항종양효과를 나타낸다는 점에서 활발히 연구가 진행되고 있다[2)11)26)30)].

가장 많이 연구되고 있는 suicide gene으로 HSV - 1 thymidine kinase를 들 수 있다. HSV - 1 thymidine kinase는 ganciclovir(GCV)와 같은 항 바이러스 핵산 유도체를 단일인산 핵산 유도체로 전환 시킬수 있고 thymidine을 monophosphate thymidine으로 전환시킬수 있다. 이런 단일 인산화 유도체는 내인성 cell kinase에 의하여 삼차인산 유도체로 인산화되고 이 삼차인산 유도체는 DNA 합성을 방해하는 역할을 한다[18)]. 다른 suicide gene으로 E.coli cytosine deaminase가 있다. cytosine deaminase는 5 - fluorocytosine(5 - FC)를 강력한 항암제인 5 - fluorouracil로 탈아민화(deamination) 시킨다[1)6)9)18)]. 5 - Fluorouracil은 5 - fluorouridine triphosphate과 5 - fluoro - deoxyuridine monophosphate로 대사된다. 5 - Fluorouridine triphosphate는 리보핵산으로 융합된후 리보솜 리보핵산과 전달자 리보핵산의 합성 과정을 방해하게 된다. 5 - Fluorodeoxyuridine monophosphate는 thymidine 합성효소를 비가역적으로 억제하고 결과적으로 DNA 합성을 억제하게 된다. TK나 CD로 transduction된 종양세포는 ganciclovir와 5 - FC 같은 전구약물을 독성 대사물로 변화시킬 수 있고 선택적으로 항종양효과를 나타내게 된다[11)12)].

효소/전구약물 유전자 치료의 장점 중의 한가지는 소위 방관자 효과(bystander effect)이다. 즉 transduction 되지 않은 주변 종양세포를 죽이는 효과를 증대시킨다[8)26)28)]. Rogulski 등은[22)] CD/TK 융합유전자를 포함하고 있는 리트로 바이러스 중개물질(retroviral vector)로 전사되고 선택된 9L gliosarcoma 모델을 이용하여 이중 suicide gene (CD/TK 융합유전자)/전구약물 요법이 항종양 효과를 나타낸다는 것을 보고했다. 그들은 CD/TK 두가지 기능의 효소가 transduction된 종양세포에 CD, TK 전구약물에 특이적인 감수성을 부여하는 것을 밝혀냈다.

본 연구는 아데노 바이러스를 이용하여 CD/TK 융합유전자를 rat C6 glioma 세포에 배양배지에서 감염시켜 multiple suicide gene 치료의 효용성을 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포주 및 재조합 아데노 바이러스

쥐 C6 glioma 세포와 전환된 인체 태아 신장 293 세포인 아데노 바이러스 5를 American Type Culture Collection (Manassas, VA)에서 구입하였다. 세포는 10% heat - inactivated fetal bovine serum, 2 mmol/L L - glutamine과 100U/ml penicillin/50ug/ml streptomycin이 보충된 Dulbecco 's modified Eagle 's medium에서 5% CO_2 인큐베이터에 배양시켰다. 실험은 5~6세대가 지난 C6 glioma 세포에 대하여 시행하였다. 복제가 안되는 재합성 ad - CD/TK cloning sequence는 다음과 같다. CD/TK 유전자를 함유하고 있는 plasmid pWZLneoCDglyTK를 제한효소인 Bam HI와 EcoRI를 이용 pWZL과 neoCDglyTK gene을 절단하고 유핵 발현 벡터인 pcDNA3의 동일한 부위로 상동 재조합의 방법으로 cloning을 한다(Invitrogen, Carlsbad, California). ad - CD/TK 융합유전자를 만들기 위해서 CMV 바이러스 전구체, CD/TK 융합유전자, bovine growth hormone polyadenylation sequence를 포함한 전체 발현단위를 제한효소인 BglⅡ, PvuⅡ를 이용하여 절단하고 상동 재조합(homologous recombination)의 방법으로 adenoviral shuttle vector인 pΔE1sp1A(Microbox, Toronto, Canada)로 BglⅡ와 EcoRV 부위에서 cloning해서 pΔE1sp1A/CD/TK를 만들었다. plasmid인 pΔE1sp1A/CD/TK을 Ad - ΔE1과 homologous recombination의 방법으로 아데노 바이러스의 E1 gene이 제거된 자리로 CD/TK gene을 cloning하여 ad - CD/TK를 만들었다[3)]. 동종 재조합의 방법으로 복제 불능의 아데노 바이러스(ad - ΔE1)를 얻기 위하여 shuttle vector는 viral plasmid pJM17과 함께 293 세포에서 전사시켰다[12)13)]. 복제불능의 상보 염기서열(ad - ΔE1, ad - β - galactosidase)은 다른 종류의 shuttle vector (pCA14, pΔE1sp1A/β - galactosidase)를 이용한 동종 재조합 방법으로 생성시켰다. 모든 바이러스는 표준적인 방법으로 293 세포 안에서 정화되어 번식되었고 plaque 도정화되었다[12)13)].

1) ad-CD/TK

PWZLneoCDglyTK(plasmid)를 이용하여 adenovirus E1 gene이 제거된 자리로 pΔE1sp1A를 이용 CD/TK gene을 융합시킨 복제 불능의 adenovirus.

2) ad-ΔE1

adenovirus 복제에 관여하는 E1 유전자가 제거된 adenovirus로 세포 내에서 복제를 통해 증식 할수 없는 adenovirus[12)13)].

3) pΔE1splA, PWZLneoCDglyTK

plasmid로서 PWZLneoCDglyTK를 이용 pΔE1splA와 상동재조합(homologous recombination)을 통하여 pΔE1splA/CD/TK plasmid를 ad - ΔE1과 합성시켜서 ad - CD/TK를 만들었다.

4) Bgl II, EcoRV

제한효소(restriction enzyme).

2. X-5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-13-D-galactoside(X-Gal) staining

β-galactosidase의 표현은 X-Gal staining을 통해 확인된다. ad-β-galactosidase로 감염된후 이틀 뒤에 C6 glioma 세포는 고정액(1.0% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in distilled water)으로 5~10분 동안 고정한 후 phosphate-buffered saline(PBS)로 2번 씻은 후 염색액(0.4mg/ml X-Gal, 4mmol/L K_4Fe, 2mmol/L $MgCl_2$ in PBS, pH 7.2)으로 37℃ 온도에서 4~24시간 동안 염색을 하였다. β-galactosidase에 의해 감염된 C6 glioma cell은 4℃온도에서 2~10시간 동안 고정액으로 고정하고 phosphate-buffered saline 으로 3번 씻어 낸후 37℃ 온도에서 24시간 동안 염색액(0.4mg/ml X-Gal, 4mmol/L K_4Fe and 2mmol/L $MgCl_2$ in PBS, pH 7.2 containing 0.02% Nonidet P-40 and 0.01% sodium deoxycholate)으로 염색하였다. 이 종양세포들은 헤마톡실린과 에오신으로 교차 염색하였다.

3. Immunoblotting analysis

$25cm^2$ 플라스크에 담긴 2×10^6 세포는 1ml Dulbecco's modified Eagle's 배지에서 각각 다른 감염 중복지수(multiplicity of infection, MOI)로 ad-ΔE1 또는 ad-CD/TK로 감염시킨다. 3~4시간후 바이러스 접종배지는 버리고 새로운 증식배지가 첨가된다. 감염시킨 후 3~4일후에 종양세포들은 phosphate buffered saline으로 씻어낸후 모으고 단백분해효소 억제제를 포함하고 있는 300ul의 용해 완충액(lysis buffer, 50mmol/l N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, pH 7.5, containing 0.15mol/L NaCl and 0.5% Nonidet p-40)으로 용해 시킨다. 같은 양의 단백질(30ug of lysate, 20ug of protein/lane)에 해당하는 미리 씻어낸 용해액(lysate)은 환원된 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 용해되고 polyvinylidene fluoride membrane으로 전이 시킨다(RPN 303F ; Amersham, Arlington Heights, IL).

면역검식은 TK(4C8 ; Dr. W.C. Summers, Yale University) 또는 α-actin(Oncogene, Cambridge, MA)에 대한 1~5ug의 단일 동종항체를 이용하여 시행하였다.

4. CD/TK 융합유전자와 관련된 세포독성의 실험연구

C6 glioma 세포를 $25cm^2$ 플라스크에 접종한후 ad-ΔE1 또는 ad-CD/TK로 100 또는 200의 중복감염지수로 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 감염시켰다. 3~4시간후 바이러스 접종군은 버리고 신선한 성장 배양액을 추가하고 종양 세포는 감염된 지 하루 뒤에 96-well plate에 옮겼다.

전구 약물로 치료하기 위해서 배양액에 10, 20, 30, 40, 50, 100ug/ml 5-FC와 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1ug/ml GCV를 각각 그리고 두가지 전구약물을 함께 첨가하였다.

종양 세포는 전구약물이 있는 상태로 4일간 유지 시킨후 고정하여 50% methanol 1% crystal violet staining solution으로 염색하고 종양세포의 생존 여부는 microplate reader 상에 540nm의 흡수율을 측정함으로써 판정하였다.

세포 생존율은 다음의 공식으로 구했다.

% cell survival = (absorbance for the experimental group-absorbance of the blank)/(absorbance for the control group-absorbance of the blank)×100

5. 통계분석

전구약물의 효과에 대한 각 그룹들은 분산분석(ANOVA)으로 분석했다. 각 값은 평균치±표준편차로 표시하였고 통계학적 유의성은 $p<0.05$를 기준으로 하였다.

결 과

1. C6 glioma 세포에서 재조합 아데노 바이러스의 감염 효율과 CD/TK 융합 유전자의 발현

재조합 아데노 바이러스를 이용한 C6 glioma 세포의 감염효율은 ad-β-galactosidase를 이용하여 종양세포를 감염시킨후 실험적으로 X-Gal 염색으로 β-galactosidase 활성도를 조사하여 증명할 수 있다. Fig. 1은 배양된 C6 glioma 세포는 효과적으로 전사된 것을 보여준다. 즉 MOI 200에서 45±7% 전사된 것에서부터 MOI 500에서 완전히 전사 된 것을 보여준다(검은색으로 표현됨). 추가로 아데노 바이러스 감염으로 인한 특이한 세포 독성, 즉 세포 공동화, 세포가 plate로부터 떨어지는 등의 세포 독성 현상등은 MOI 1000의 높은 중복 감염지수에서도 관찰되지 않았다. 다음에 Immunoblotting 분석을 통해서 CD/TK 융합 단백질의 표현을 조사 하였다. C6 또는 293 세포를 각기 다른 중복감염 지수로 ad-CD/TK로 감염시키고 TK 단백질에 특이한 일차 항체를 이용 immunoblotting 분석을 시행하였다.

ad-CD/TK로 감염된 양쪽 세포군에서 CD/TK 융합 단

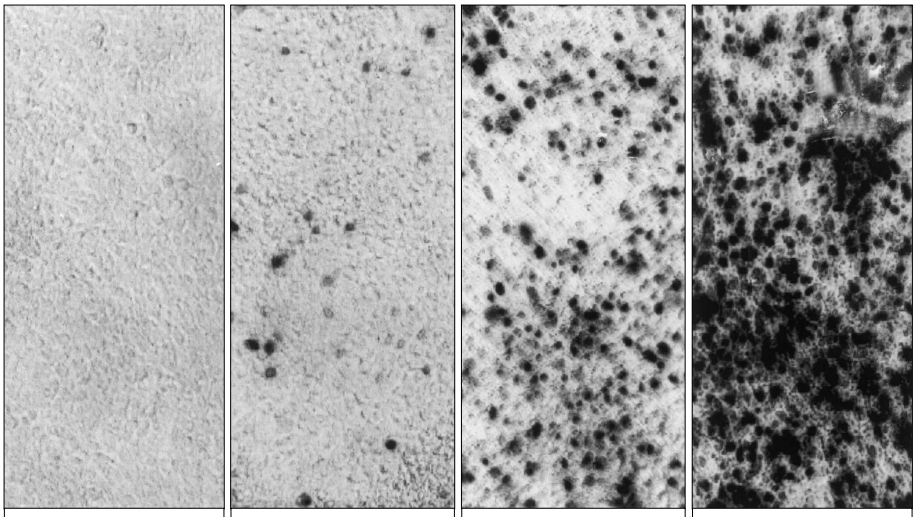

Fig. 1. The transduction efficiency of recombinant adenovirus ion C6 glioma cells. Transduction efficiency was determined by examining expression of β-galactosidase (LacZ) after infecting the cells with ad-β-galactosidase. Dark staining represented successful β-galactosidase gene expression in the cells. The expression of β-galactosidase in cultured C6 glioma cells. The cells were infected with ad-β-galactosidase at MOI of 100, 200 or 500 and then stained with X-gal. Two days post-infection.

백질을 확인할 수 있었고 이 사실은 ad-CD/TK 감염된 후 CD/TK 융합 유전자의 표현이 적절히 되었음을 의미한다 (Fig. 2). Fig. 2에서 보는 바와 같이 같은 수준의 α-actin 이 각각의 세포군에서 측정되었는데 이것은 각각의 세포군에 같은 양의 단백질이 생성되었음을 의미한다. 293 세포는 CD/TK를 발견하는데 상당히 낮은 중복감염지수에서도 가능하였고 CD/TK가 표현되는 양은 특이한 차이가 없었다.

C6 glioma 세포에서는 같은 수준의 CD/TK를 표현하기 위해서는 보다 높은 중복 감염지수로 감염시켜야 하였다 (0.1-1 MOI 293세포 대 10 MOI C6 뇌교종 세포) CD/TK 표현에 있어서 MOI를 증가시키는 것에 대한 긍정적인 효과는 C6 glioma 세포에서 관찰되었다. 높은 중복 감염지수로 감염시킨 세포에서는 면역 반응을 보인 CD/TK 단백질이 많이 관찰되었다(Fig. 2). 또 1000 MOI로 감염시킨 것과 100 MOI로 감염시킨 것을 비교했을 때 CD/TK 표현되는 양은 큰 차이가 없었고 500 MOI가 넘을 경우 바이러스 감염의 포화효과를 나타내었다.

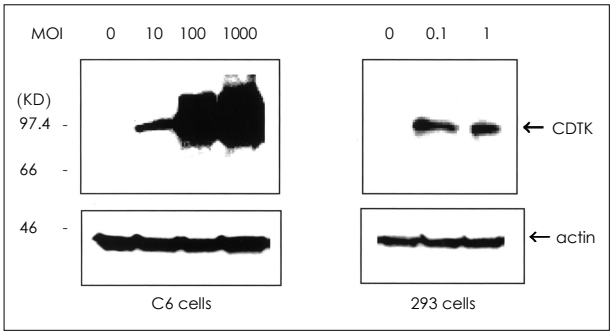

Fig. 2. The expression of CD/TK in C6 glioma or 293 cells. The cells were infected with ad-CD/TK at designated MOIs and the equal amount of proteins was subjected to 6% SDS-PAGE. The CD/TK fusion proteins were visualized by immunoblotting analysis with monoclonal antibody to TK. The position of fusion protein CD/TK was indicated by arrow.

2. ad-CD/TK 감염후 전구약물의 세포독성에 대한 실험 연구

10 MOI에서는 바이러스 자체는 어느정도는 세포독성을 나타냈지만 전구약물 혼합요법으로는 세포 독성 효과를 관찰할 수 없었다. 그러므로 CD/TK의 표현이 전구약물(5-FC, GCV)과 병합치료를 시행하였을 경우 세포독성을 일으키는 지의 여부를 알기 위해서는 C6 glioma세포를 MOI 100~200에서 ad-CD/TK 또는 ad-ΔE1으로 감염시킨 후에 5-FC와 GCV 약물을 각각 다른 농도에서 그리고 혼합농도에서 관찰하였다. 30ug/ml 이상의 농도에서 5-FC는 현저한 세포독성을 나타내었고 MOI 100에서 0.3ug/ml 이상의 농도에서 GCV는 현저한 세포독성을 나타내었다. MOI 200에서 5-FC(10ug/ml) GCV(0.1mg/ml)의 낮은 약물농도에서 비슷한 세포 독성을 나타내었다. 그러나 세포독성의 범위는 50ug/ml 5-FC, 0.5ug/ml GCV에서 포화 상태에 이르렀다. 또 Fig. 3C에서 보는 바와같이 GCV와 5-FC로 동시에 치료하는 병합요법은 보다 큰 세포독성을 나타내었다. 100 MOI일 때 10ug/ml 5-FC 또는 0.1 ug/ml GCV는 현저한 세포 독성을 나타내지 못하였다(10 ug/ml 5-FC의 경우 종양세포가 줄지않았고 0.1ug/ml GCV 경우 28±10%가 종양세포가 줄었다.). 그러나 같은 농도의 10ug/ml 5-FC와 0.1ug/ml GCV를 같이 병합해서 사용했을 때 53±8%의 종양세포가 감소되는 효과가 있었다. 각각 다른 정도의 전구약물 농도와 MOI에서도 5-FC와 GCV를 병합해서 사용했을 때 동일하게 향상된 세포독성 효과를 보인 반면에 단일 전구 약물로 치료했을 경우 세포독성에 있어서 포화 효과를 보였다(Fig. 3C).

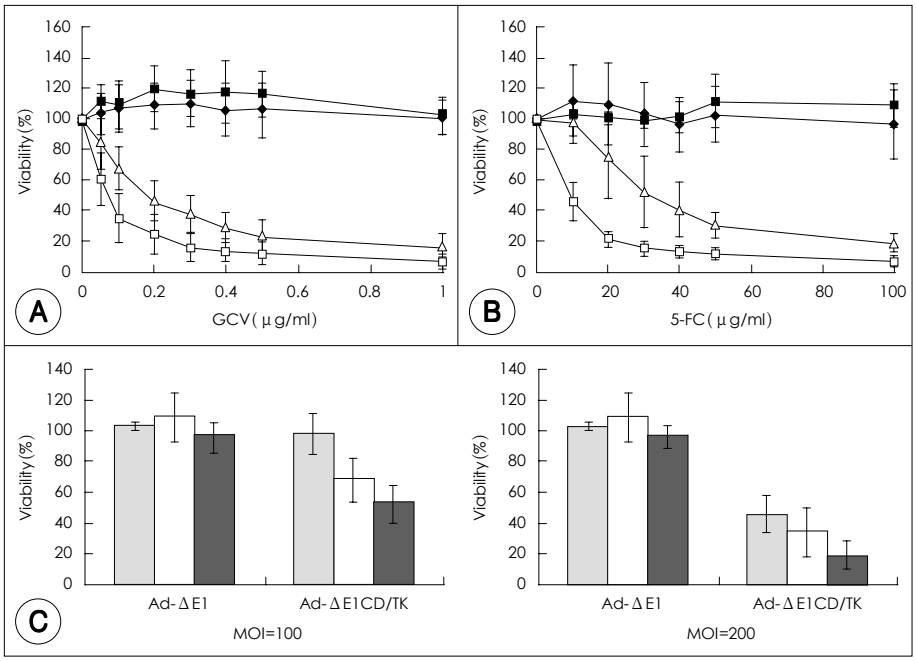

Fig. 3. *In vitro* cytotoxicity of ad-CD/TK combined with GCV or 5-FC treatment in C6 glioma cells. The cells infected with ad-CD/TK were exposed to GCV or 5-FC alone or in combined treatments after plating into 96 wells. The cell survival rate was determined by crystal violet staining Six days after infection. The mean values of at least three independent experiments are represented and standard errors are represented by error bars. A : Sensitivity to GCV of the cells transduced with ad-CD/TK. The cells were infected with ad-CD/TK at MOI of 100(△) or 200(□). As a control group, the cells were mock-infected(◆) or infected with ad-ΔE1 at MOI of 200(■). B : Sensitivity to 5-FC of the cells transduced with ad-CD/TK. The data were represented as Fig. 3A. C : Additive effect of GCV and 5-FC treatment. The cells were treated with 5-FC of 10g/ml(□), GCV of 0.1g/ml(□) or both(■) after transduction with ad-ΔE1 or ad-CD/TK at MOI of 100(left) or 200(Right)

고 찰

종양 성장을 억제하기 위한 항암제의 사용은 항암 약물의 전신적인 독성으로 인해 종종 제한된다. 최근 분자생물학과 세포 생물학 분야의 발전으로 유전자 치료가 악성 뇌종양의 효과적인 치료법으로서 대두 되었다. 아데노 바이러스는 염색체 분열후 상태의 세포를 감염시킬 수 있고 높은 세포 감염율을 보이며 병원성(pathogenicity)이 낮기 때문에 종양의 유전자 치료에 효과적인 매개물질(vector)이지만 강력한 염증성 반응을 촉진시켜 감염된 세포의 파괴를 유발할 수 있다[3)7)10)].

암 유전치료에 있어서 suicide gene 전구약물 치료법은 비독성 전구약물을 독성있는 항암제로 전환시킬수 있는 효소(CD/TK)를 종양세포에 전달함으로써 항암제와 관련된 전신적인 독성을 최소화시키는 개념을 기초로 한다. 즉, 종양의 주변 부위에서 독성 물질의 농도를 높이고 이로 인해 치료 효과를 최대화 할 수 있는 것이다[18)]. TK/GCV, CD/5 - FC 그리고 human deoxycytidine kinase/cytosine arabinoside를 포함한 다양한 효소 - 전구약물 치료법의 항암효과에 관한 많은 연구들이 있다[8)10)19)25)]. Nishihara 등[20)]은 HSV - 1 TK/GCV가 가장 큰 치료 index를 나타내고 반면 CD/5 - FC는 가장 강력한 방관 효과(bystander effect)를 나타낸다고 보고하였다[15)20)27)].

따라서, CD/TK 융합유전자는 개별적인 CD와 TK suicide gene 치료와 관련하여 부가적인 효과를 제공할 수 있을 것이다[22)].

본 연구에서 CD/TK 융합 단백질 치료는 개별적인 효소/전구 약물치료와 비교시 향상된 항암효과를 나타내었다. 5 - FC와 GCV와 결합된 CD/TK 융합 단백질을 발현한 C6 glioma 세포는 단독적인 유전자/전구약물 치료 방법에서 얻어진 결과보다 더 큰 세포 독성을 나타내었다(Fig. 3). 종양세포 독성에 대한 CD/TK 융합 단백질/전구 약물의 복합 치료효과는 Rogulski 등이 연구한 결과들과 비교할 만하다[22)]. 그러나, HSV - 1 TK와 CD로 폐 선종암을 치료한 결과들과는 달리[15)] 본 연구에서는 CD/TK 유전자로 전사된 C6 종양세포가 GCV 보다 5 - FC가 더 민감하지 않다는 것을 관찰 하였다.

융합유전자의 다른 잇점은 단일 CD/5 - FC 또는 TK/GCV 치료에 대한 약물 저항성을 피할수 있다는 것이다[8)9)]. CD/TK 융합 유전자 치료는 방사선 치료와 병합 할수 있고 상호 협동작용으로 세포 독성을 증가 시킬수 있다는 것

이 또 다른 장점이 될 수 있다[17)22)]. 요약하면 본 연구는 CD/TK 융합 유전자를 표현하는 재조합 아데노 바이러스를 C6 lioma 세포에 감염시켜 전사 한후 전구약물을 투여하여 항종양효과를 관찰 하였고 CD/TK 융합 유전자 5 - FC/GCV 치료는 단일 유전자 치료보다 치료 효과가 좋은 것을 확인 하였다. 본 연구를 통하여 아데노 바이러스를 이용한 suicide gene 전구약물의 융합 유전자 치료는 향후 뇌 종양 치료의 새로운 가능성을 제시 하였다고 판단되었다.

결 론

본 연구는 아데노 바이러스를 매개로 한 CD/TK 유전자의 융합 유전자 전달을 통하여 rat C6 glioma 세포에서 증가된 항종양효과를 확인하였다. 본 연구 결과를 통하여 아데노 바이러스 중개물질을 통한 suicide gene의 융합유전자의 직접 주입을 통한 치료는 향후 악성종양을 효과적으로 치료할 수 있을 것으로 판단되었다.

• 논문접수일 : 2001년 7월 1일
• 심사완료일 : 2001년 10월 8일
• 책임저자 : 장 진 우
120 - 752 서울 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 신촌세브란스병원 신경외과학교실
전화 : 02) 361 - 5624, 전송 : 02) 393 - 9979
E - mail : jchang@yumc.yonsei.ac.kr.

References

1) Abbruzzese JL, Levin B : Treat*ment of advanced colorectal cancer. Hematol Oncol Clin North Am 3 : 135-153, 1989*
2) Barba D, Hardin J, Ray J, Gage FH : *Thymidine kinase mediated killing of rat brain tumors. J Neurosurg 7 : 729-735, 1993*
3) Blackburn RV, Galoford SS, Corry PM, Lee YJ : *Adenoviral transduction of a cytosine deaminase/thymidine kinase fusion gene into prostate carcinoma cells enhances prodrug and radiation sensitivity. Int J Cancer 82 : 293-297, 1999*
4) Bradford R, Darling JL, Thomas DGT : *The developement of an animal model of glioma for use in experimental neurooncology. Br J Neurosurg 3 : 197-210, 1989*
5) Brandes A, Soesan M, Fiorentino MV : *Medical treatment of high grade malignant glioma in adults : An overview. Anticancer Res 11 : 719-727, 1991*
6) Calabris P, Chabner BA : A*ntineoplastic agents, in Gilman AG, Rall T, Nies AS, Taylor P (eds) : Goodman and Gilman's The pharmacological Basis of Therapeutics. New York, Pergamon, 1990, ed 8, pp1209-1263*
7) Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SLC : *Gene therapy for brain tumors : Regressoion of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 91 : 3054-3057, 1994*
8) Cool V, Pirotte B, Gerard C, Dargent JL, Baudson N, Levivier M, et al : *Curative potential of herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer in rats with 9L gliosarcoma. Hum Gene Ther 7 : 627-635, 1996*
9) Copur S, Aiba K, Drake JC, Allegra CJ, Chu E : *Thymidylate synthetase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil. Biochem Pharmacol 49 : 1419-1426, 1995*
10) Esandi MC, van Someren GD, Vincent AJ, van Bekkum DW, Valerio D, Bout A, et al : *Gene therapy of experimental malignant mesothelioma using adenovirus vectors encoding the HSVtk gene. Gene Ther 4 : 280-287, 1997*
11) Ezzeddine ZD, Martuza RL, Platika D, Short MP, Malick A, Choi B, et al : *Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. Nature New Biol 3 : 608-614, 1991*
12) Graham FL, Prevec L : *Methods for construction of adeonvirus vectors. Mol Biotechnol 3 : 207-220, 1995*
13) Graham FL, van der Eb AJ : *A new technique for the assay of infectivity of adeonvirus 5 DNA. Virology 52 : 456-467, 1973*
14) Hirschowits EA, Ohwada A, Pascal WR, Russi TJ, Crystal RG : *In vivo adenovirus-mediated gene transfer of the E.coli cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-flurocytosine. Hum Gene Ther 6 : 1055-1063, 1995*
15) Hoganson DK, Batra RK, Olsen JC, Boucher RC : *Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma. Cancer Res 56 : 1315-1323, 1996*
16) Kim JH, Kim SH, Brown SL, Freytag SO : *Selective enhancement by an antiviral agent of the radiation-induced cell killing of human glioma cells transduced with HSV-tk gene. Cancer Res 54 : 6053-6056, 1994*
17) Kim JH, Kolozsvary A, Rogulski K, Khil MS, Brown SL, Freytag SO : *Selective radiosensitization of 9L glioma in the brain transduced with double suicide fusion gene. Cancer J Sci Am 4 : 364-369, 1998*
18) Moolten FL : *Drug sensitivity ("suicide") genes for selective cancer chemotherapy. Cancer Gene Ther 1 : 279-287, 1994*
19) Mullen CA, Coale MM, Low R, Blaese RM : *Tumors expressing the cytosine deaminase suicide gene can be eliminated in vivo with 5-flurocytosine and induce protective immunity to wild-type tumor. Cancer Res 54 : 1503-1506, 1994*
20) Nishihara E, Nagayama Y, Narimatsu M, Namba H, Watanabe M, Niwa M, et al : *Treatment of thyroid carcinoma cells with four different suicide gene/prorug combinations in vitro. Anticancer Res 18 : 1521-1525, 1998*
21) Perez-Cruet MJ, Trask TW, Chen SH, Goodman JC, Woo SL, Grossman RG, et al : *Adenovirus-mediated gene therapy of experimental gliomas. J Neurosci Res 39 : 506-511, 1995*
22) Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, Freytag SO : *Glioma cells*

transduced wtih an E.coli CD HSV-q TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. Hum Gene Ther 8 : 73-85, 1997

23) Shine HD, Trask TW, Perez-Cruet MJ, Goodman S, Rajagopolan S, Chen SH, et al : *Adenovirus-mediated gene therapy for CNS tumors b : Efficacy and toxicity in experimental models. Caner Gene Ther 2 : 309-342, 1995*

24) Silbergeld DL, Rostomily RC, Alvord EC Jr : *The cause of death in patients with glioblastoma is multifactorial glioblastoma in adults. J Neurooncol 10 : 179-185, 1991*

25) Singhal S, Kaiser LR : *Cancer chemotherapy using suicide genes. Surg Oncol Clin North Am 7 : 505-536, 1998*

26) Takamiya Y, Short P, Moolten FL, Fleet C, Mineta T, Breakefield XO, et al : *An experimental model of retrovirus gene therapy for malingnant brain tumors. J Neurosurg. 79 : 104-110, 1993*

27) Trinh QT, Austin EA, Murry DM, Knick VC, Huber BA : *Enzyme/prodrug gene therapy : Comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosine versus thymidine kinase/ganciclovir enzyme/prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. Cancer Res 55 : 4808-4812, 1995*

28) Vincent AJPE, Vogels R, Someren GV, Esandi MC, Noteboom JL, Avezaat CJJ, et al : *Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy for rat malignant brain tumors. Hum Gene Ther 7 : 197-205, 1996*

29) Whittle IR, Macarthur DC, Malcolm GP, Li M, Washinton K, Ironside JW : *Can experimental models of rodent implantation glioma be improved? A study of pure and mixed glioma cell line tumors. J Neurooncol 36 : 231-242, 1998*

30) Wu JK, Cano WG, Meylaerts SAG, Qi P, Vrionis F, Cherington V : *Bystander tumoricidal effect in the treatment of experimental brain tumors. Neurosurgery 35 : 1094-1103, 1994*